



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110672831 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201910850369.4

(22)申请日 2019.09.10

(71)申请人 中国科学院上海技术物理研究所

地址 200083 上海市虹口区玉田路500号

(72)发明人 万雄 王泓鹏 袁汝俊

(74)专利代理机构 上海沪慧律师事务所 31311

代理人 郭英

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/65(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

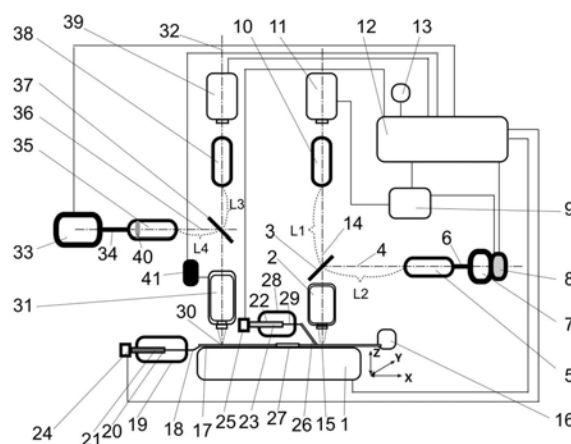
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法,该方法是在微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光检测仪上实现的,该方法包括初始化及自聚焦、共焦拉曼光谱信息获取、免疫时域分辨荧光光谱信息获取、综合光谱数据后处理四个步骤。本发明的有益效果是,光路的共焦设计可有效提高空间分辨率,可对血液中的微小区域分子进行探测;长荧光寿命免疫标记为多次时域分辨采样提供了基础;条纹相机传感器光谱仪实现单次激光诱导荧光多次采集;共焦拉曼与多幅时域荧光提供综合光谱信息,提高物种血液鉴别能力。



1. 一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法,该方法是在微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光光谱血液检测仪上实现的,所述检测仪由三维电动平台(1)、显微镜(2)、双色片(3)、光纤耦合镜(5)、荧光接收光纤(6)、荧光光谱仪(7)、条纹相机传感器(8)、数字延迟发生器(9)、紫外激光扩束镜(10)、紫外低重频脉冲激光器(11)、主控制器(12)、无线网络收发器(13)、废液罐(16)、拉曼物镜(31)、拉曼光谱仪(33)、拉曼光纤(34)、拉曼耦合镜(35)、拉曼双色片(37)、拉曼扩束镜(38)、拉曼激光器(39)、瑞利滤光片(40)、自聚焦模组(41)及自动进样系统组成;其特征在于所述的方法包括以下步骤:

1) 初始化及自聚焦

将珍稀动物待测血液注入血液管,将螯合标记物注入试剂管;将自动进样台的电动推进器、检测细管、血液管、血液接头组装好;将试剂进样台的试剂推进器、试剂管、试剂接头、Y形管组装好;将中间接头联接好检测细管与Y形管;将Y形管与废液罐接好;然后将整个自动进样系统安装于三维电动平台上;

主控制器发出指令启动电动推进器,以一定的速度推动血液管中的待测血液通过血液接头流入检测细管,并通过中间接头流入Y形管;主控制器发出指令启动试剂推进器,以一定的速度推动试剂管中的螯合标记物与检测细管中的待测血液在Y形管中相遇混合,产生免疫反应后,生成荧光标记位点,得到标记血液,从Y形管出口流出;

主控制器发出指令,启动数字延迟发生器;数字延迟发生器按设置的延迟T,发出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;主控制器发出指令,使条纹相机传感器工作于单帧曝光模式,并设置曝光时间 E_s ;

紫外低重频脉冲激光器发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至Y形管出口区域,产生的后向信号经光纤耦合镜耦合进入荧光光谱仪,到条纹相机传感器进行光电转换;条纹相机传感器将采集到的光谱信号传送到主控制器;主控制器计算该光谱信号的总强度I,即光谱曲线包围的总面积;

主控制器发出指令,控制三维电动平台沿XYZ三个轴进行步进微动调整,在每个位置,数字延迟发生器按设置的延迟T,发出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;主控制器计算该位置回波光谱信号的总强度I,直至I到达最大值,此时,紫外激光已准确聚焦至Y形管出口中的标记血液;

2) 共焦拉曼光谱信息获取

主控制器发出指令启动自聚焦模组、拉曼激光器及拉曼光谱仪,并设定拉曼光谱仪的曝光时间;拉曼激光器发出的拉曼泵浦激光扩束聚焦至检测细管区域,产生的后向信号经拉曼耦合镜耦合进入拉曼光谱仪,拉曼光谱仪将采集到的光谱信号传送到主控制器;主控制器计算该光谱信号的总强度 I_R ,总强度 I_R 为光谱曲线包围的总面积;

主控制器发出指令,由自聚焦模组带动拉曼物镜沿拉曼发射轴上下移动,在每个位置,主控制器计算该位置回波光谱信号的总强度 I_R ,直至 I_R 到达最大值,此时,拉曼泵浦激光准确聚焦至检测细管中的待测血液;在此紧聚焦状态下,拉曼光谱仪将拉曼聚焦点处待测血液的拉曼光谱信号传送到主控制器;

3) 免疫时域分辨荧光光谱信息获取

在此紧聚焦状态下,主控制器发出指令,使条纹相机传感器工作于连续多帧采集模式;设置单帧曝光时间 E_m 、采样周期 Δt 以及总采集时间B;数字延迟发生器按设置的延迟T,发

出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;

紫外低重频脉冲激光器发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至标记血液,产生的后向免疫荧光信号经光纤耦合镜耦合进入荧光光谱仪,到条纹相机传感器进行光电转换;

条纹相机传感器将采集到的光谱信号传送到主控制器;条纹相机传感器按设置好的单帧曝光时间 E_m 、采样周期 Δt 以及总采集时间 B 进行时域分辨高速连续曝光,将随时间衰减的由单发激光脉冲激发的 $B/\Delta t$ 个荧光光谱记录下来并送至主控制器;

4) 综合光谱数据后处理

主控制器对待测血液的共焦拉曼谱线、以及 $B/\Delta t$ 个荧光光谱进行曲线形态,曲线时域变化速率等参数进行提取及分析,构建其综合光谱特征数据库,并将数据库信息通过无线网络收发器送至出入境监管部门云系统;对珍稀动物血液进行快速检测、建库与识别,方便海关进出口检测检疫部门进行珍稀动物的溯源、鉴别及保护。

一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种血液检测方法,尤其涉及一种采用微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光光谱的血液检测方法,适用于海关对出口的珍稀动物血液进行检测鉴别,属于光电探测领域。

背景技术

[0002] 在海关进出口各类商品中,各国对血液制品的进出口大都采取严格的管控措施。由于动物,尤其是重要的珍稀动物,其血液成分中含有珍稀物种的遗传特性等重要的生物信息,一旦外流将影响国家的生物安全,因此禁止出口。但不法分子往往在普通动物血液制品中偷带珍稀动物血液,所以急需特制的仪器设备进行检测,以区别普通动物与珍稀动物,以及珍稀动物的类别,以制止血液走私违法犯罪行为,保障国家的生物安全。

[0003] 珍稀动物血液的快速检测与鉴别是件困难的事情,因为有些动物的血液的基因差异极小,其外在的光学特性极其相近,往往种间差异与种内差异都处一同一量级。为此,急需找到一种可行的方法。

[0004] 一种有效分析工具为共焦拉曼技术,它可将拉曼泵浦激光聚焦至一极小区域,覆盖若干个生物大分子,并拾取分子振动引起的拉曼频移,从而对探测对象的分子构成进行有效识别;另一种强有力的分析工具为时间分辨免疫荧光分析,它采用镧系稀土元素螯合物作为标记物,利用该类荧光物质寿命长和斯托克斯位移大的特点,通过时间分辨,有效排除非特异性本底荧光干扰,灵敏度高,成为生物学超微量分析强有力的工具。由于珍稀动物血液极其珍贵,量很小,因此需进行小量及微量分析。微流控(Microfluidics)指的是使用微米尺度管道处理或操纵微小流体的系统,可满足微量生物分析的要求。它具有微型化、集成化等特征,微流控装置通常被称为微流控芯片,也被称为芯片实验室(Lab on a Chip)和微全分析系统(micro-Total Analytical System)。将以上共焦拉曼及免疫时域分辨荧光精细光谱手段与微流控进样结合,可满足珍稀动物血液分析及鉴别的需求。

[0005] 综合上述,针对珍稀动物血液分析及鉴别的需求,本发明提出一种采用微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光的血液检测方法,适用于对珍稀动物进行快速检测、建库与识别,方便海关进出口检测检疫部门进行珍稀动物的溯源、鉴别及保护。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光的检测方法,可精确获取珍稀血液中血红蛋白、细胞质、生物大分子等物质成份的共焦拉曼及免疫时域分辨荧光信号,满足珍稀血液的检测、鉴别、溯源、保护等需求。

[0007] 本发明提出的微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光的检测方法是在微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光检测仪上实现的,检测仪由三维电动平台、显微物镜、双色片、光纤耦合镜、荧光接收光纤、荧光光谱仪、条纹相机传感器、数字延迟发生器、紫外激光扩束镜、紫外低重频脉冲激光器、主控制器、无线网络收发器、废液罐、拉曼物镜、拉曼光谱仪、拉曼光

纤、拉曼耦合镜、拉曼双色片、拉曼扩束镜、拉曼激光器、瑞利滤光片、自聚焦模组及自动进样系统组成；

[0008] 其中自动进样系统由自动进样台和试剂进样台组成；自动进样台由电动推进器、检测细管、血液管、血液接头组成；试剂进样台由试剂推进器、试剂管、试剂接头、Y形管组成；

[0009] 血液接头联接血液管与检测细管；电动推进器推动血液管中的待测血液通过血液接头流入检测细管，并通过中间接头流入Y形管；Y形管为两进一出，其中一个进口通过中间接头联接检测细管，另一进口通过试剂接头与试剂管联接；试剂推进器推动试剂管中的整合标记物与待测血液在Y形管中相遇混合，产生免疫反应后，生成荧光标记位点，得到标记血液，从Y形管出口流出，检测完成后，由废液罐收集；

[0010] 紫外低重频脉冲激光器沿发射光轴发出的紫外脉冲激光经紫外激光扩束镜扩束准直，穿过双色片，经显微物镜聚焦至Y形管出口中的标记血液；产生的后向荧光信号沿发射光轴通过显微物镜，经双色片反射后沿接收光轴行进，经光纤耦合镜耦合进荧光接收光纤，再进入荧光光谱仪；荧光光谱仪中的分光元件将荧光信号分光后投射到条纹相机传感器进行光电转换；条纹相机传感器中有可调门宽（即曝光时间）高速连续快门，可以固定的采样周期 Δt （即时域采样间隔）进行时域分辨高速连续曝光，将随时间衰减的多个荧光光谱记录下来以供后续分析；

[0011] 自聚焦模组可带动拉曼物镜沿拉曼发射轴移动，从而实现焦点的移动；拉曼激光器沿拉曼发射轴发出的拉曼泵浦激光经拉曼扩束镜扩束准直，穿过拉曼双色片，经拉曼物镜聚焦至检测细管中拉曼聚焦点处的待测血液；产生的后向拉曼散射信号沿拉曼发射轴通过拉曼物镜，经拉曼双色片反射后沿拉曼接收轴行进，拉曼耦合镜耦合进拉曼光纤，拉曼耦合镜中有瑞利滤光片，可滤去拉曼回波信号中的与泵浦光波长相同的瑞利散射信号，进入拉曼光纤中的拉曼信号再进入拉曼光谱仪，分光与光电转换后得到拉曼光谱供后续分析；

[0012] 拉曼发射轴、拉曼接收轴垂直、发射光轴、接收光轴等四轴共面，拉曼发射轴与拉曼接收轴垂直，发射光轴与接收光轴垂直，拉曼发射轴与发射光轴平行；光纤耦合镜与紫外激光扩束镜孔径相等，且两者到双色片的距离 L_2 与 L_1 相等，基本满足共焦对称要求；拉曼耦合镜与拉曼扩束镜孔径相等，且两者到拉曼双色片的距离 L_3 与 L_4 相等，基本满足共焦对称要求；

[0013] 数字延迟发生器以脉冲外触发方式，启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器，并设置两个外触发脉冲之间的延时 T ，以得到最佳信噪比的时域分辨荧光光谱；

[0014] 主控制器输入输出端口控制程序可实现对三维电动平台、电动推进器、试剂推进器、数字延迟发生器、条纹相机传感器、拉曼激光器、拉曼光谱仪、自聚焦模组的控制；且可接收拉曼光谱仪输出的共焦拉曼光谱信息以及条纹相机传感器输出的免疫时域分辨荧光光谱信息，并构建对应珍稀动物血液的综合光谱数据库，进行血液分析与分类鉴别，实现数据库的查询和远程传输；还可通过无线网络收发器联接海关部门云系统，实现数据库的上传、下载与云端查询；

[0015] 本发明提出的微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光光谱血液检测方法包括以下步骤：

[0016] (1) 初始化及自聚焦

[0017] 将珍稀动物待测血液注入血液管,将螯合标记物注入试剂管;将自动进样台的电动推进器、检测细管、血液管、血液接头组装好;将试剂进样台的试剂推进器、试剂管、试剂接头、Y形管组装好;将中间接头联接好检测细管与Y形管;将Y形管与废液罐接好;然后将整个自动进样系统安装于三维电动平台上;

[0018] 主控制器发出指令启动电动推进器,以一定的速度推动血液管中的待测血液通过血液接头流入检测细管,并通过中间接头流入Y形管;主控制器发出指令启动试剂推进器,以一定的速度推动试剂管中的螯合标记物与检测细管中的待测血液在Y形管中相遇混合,产生免疫反应后,生成荧光标记位点,得到标记血液,从Y形管出口流出;

[0019] 主控制器发出指令,启动数字延迟发生器;数字延迟发生器按设置的延迟T,发出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;主控制器发出指令,使条纹相机传感器工作于单帧曝光模式,并设置曝光时间 E_s ;

[0020] 紫外低重频脉冲激光器发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至Y形管出口区域,产生的后向信号经光纤耦合镜耦合进入荧光光谱仪,到条纹相机传感器进行光电转换;条纹相机传感器将采集到的光谱信号传送到主控制器;主控制器计算该光谱信号的总强度I(注:光谱曲线包围的总面积);

[0021] 主控制器发出指令,控制三维电动平台沿XYZ三个轴进行步进微动调整,在每个位置,数字延迟发生器按设置的延迟T,发出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;主控制器计算该位置回波光谱信号的总强度I,直至I到达最大值,此时,紫外激光已准确聚焦至Y形管出口中的标记血液;

[0022] (2) 共焦拉曼光谱信息获取

[0023] 主控制器发出指令启动自聚焦模组、拉曼激光器及拉曼光谱仪,并设定拉曼光谱仪的曝光时间;拉曼激光器发出的拉曼泵浦激光扩束聚焦至检测细管区域,产生的后向信号经拉曼耦合镜耦合进入拉曼光谱仪,拉曼光谱仪将采集到的光谱信号传送到主控制器;主控制器计算该光谱信号的总强度 I_R (注:光谱曲线包围的总面积);

[0024] 主控制器发出指令,由自聚焦模组带动拉曼物镜沿拉曼发射轴上下移动,在每个位置,主控制器计算该位置回波光谱信号的总强度 I_R ,直至 I_R 到达最大值,此时,拉曼泵浦激光准确聚焦至检测细管中的待测血液;在此紧聚焦状态下,拉曼光谱仪将拉曼聚焦点处待测血液的拉曼光谱信号传送到主控制器;

[0025] (3) 免疫时域分辨荧光光谱信息获取

[0026] 在此紧聚焦状态下,主控制器发出指令,使条纹相机传感器工作于连续多帧采集模式;设置单帧曝光时间 E_m 、采样周期 Δt 以及总采集时间B;数字延迟发生器按设置的延迟T,发出两个触发脉冲,先后启动紫外低重频脉冲激光器和条纹相机传感器;

[0027] 紫外低重频脉冲激光器发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至标记血液,产生的后向免疫荧光信号经光纤耦合镜耦合进入荧光光谱仪,到条纹相机传感器进行光电转换;

[0028] 条纹相机传感器将采集到的光谱信号传送到主控制器;条纹相机传感器按设置好的单帧曝光时间 E_m 、采样周期 Δt 以及总采集时间B进行时域分辨高速连续曝光,将随时间衰减的由单发激光脉冲激发的 $B/\Delta t$ 个荧光光谱记录下来并送至主控制器;

[0029] (4) 综合光谱数据后处理

[0030] 主控制器对待测血液的共焦拉曼谱线、以及 $B/\Delta t$ 个荧光光谱进行曲线形态,曲线

时域变化速率等参数进行提取及分析,构建其综合光谱特征数据库,并将数据库信息通过无线网络收发器送至出入境监管部门云系统;对珍稀动物血液进行快速检测、建库与识别,方便海关进出口检测检疫部门进行珍稀动物的溯源、鉴别及保护。

[0031] 本发明的有益效果是,光路的共焦设计可有效提高空间分辨率,可对血液中的微小区域分子进行探测;长荧光寿命免疫标记为多次时域分辨采样提供了基础;条纹相机传感器光谱仪实现单次激光诱导荧光多次采集;共焦拉曼与多幅时域荧光提供综合光谱信息,提高物种血液鉴别能力。

附图说明

[0032] 图1为本发明系统结构示意图,图中:1——三维电动平台;2——显微物镜;3——双色片;4——接收光轴;5——光纤耦合镜;6——荧光接收光纤;7——荧光光谱仪;8——条纹相机传感器;9——数字延迟发生器;10——紫外激光扩束镜;11——紫外低重频脉冲激光器;12——主控制器;13——无线网络收发器;14——发射光轴;15——标记血液;16——废液罐;17——检测细管;18——血液接头;19——自动进样台;20——血液管;21——待测血液;22——试剂管;23——螯合标记物;24——电动推进器;25——试剂推进器;26——Y形管;27——中间接头;28——试剂进样台;29——试剂接头;30——拉曼聚焦点;31——拉曼物镜;32——拉曼发射轴;33——拉曼光谱仪;34——拉曼光纤;35——拉曼耦合镜;36——拉曼接收轴;37——拉曼双色片;38——拉曼扩束镜;39——拉曼激光器;40——瑞利滤光片;41——自聚焦模组。

具体实施方式

[0033] 本发明具体实施方式如图1所示。

[0034] 本发明提出的微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光的检测方法是在微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光检测仪上实现的,检测仪由三维电动平台1、显微物镜2、双色片3、光纤耦合镜5、荧光接收光纤6、荧光光谱仪7、条纹相机传感器8、数字延迟发生器9、紫外激光扩束镜10、紫外低重频脉冲激光器11、主控制器12、无线网络收发器13、废液罐16、拉曼物镜31、拉曼光谱仪33、拉曼光纤34、拉曼耦合镜35、拉曼双色片37、拉曼扩束镜38、拉曼激光器39、瑞利滤光片40、自聚焦模组41及自动进样系统组成;

[0035] 其中自动进样系统由自动进样台19和试剂进样台28组成;自动进样台19由电动推进器24、检测细管17、血液管20、血液接头18组成;试剂进样台28由试剂推进器25、试剂管22、试剂接头29、Y形管26组成;

[0036] 血液接头18联接血液管20与检测细管17;电动推进器24推动血液管20中的待测血液21通过血液接头18流入检测细管17,并通过中间接头27流入Y形管26;Y形管26为两进一出,其中一个进口通过中间接头27联接检测细管17,另一进口通过试剂接头29与试剂管22联接;试剂推进器25推动试剂管22中的螯合标记物23与待测血液21在Y形管26中相遇混合,产生免疫反应后,生成荧光标记位点,得到标记血液15,从Y形管26出口流出,检测完成后,由废液罐16收集;

[0037] 紫外低重频脉冲激光器11(本实施例为波长266nm、重频小于1Hz、单脉冲能量0.5mJ、脉冲宽度6ns,由外触发控制出光)沿发射光轴14发出的紫外脉冲激光经紫外激光扩

束镜10扩束准直,穿过双色片3,经显微物镜2聚焦至Y形管26出口中的标记血液15;产生的后向荧光信号(本实施例为波长大于266nm的荧光信号)沿发射光轴14通过显微物镜2,经双色片3反射后沿接收光轴4行进,经光纤耦合镜5耦合进荧光接收光纤6,再进入荧光光谱仪7;荧光光谱仪7中的分光元件将荧光信号分光后投射到条纹相机传感器8进行光电转换;条纹相机传感器8中有可调门宽(即曝光时间)高速连续快门,可以固定的采样周期 Δt (即时域采样间隔)进行时域分辨高速连续曝光,将随时间衰减的多个荧光光谱记录下来以供后续分析;

[0038] 自聚焦模组41可带动拉曼物镜31沿拉曼发射轴32移动,从而实现焦点的移动;拉曼激光器39(本实施例为532nm单纵模窄线宽连续激光器)沿拉曼发射轴32发出的拉曼泵浦激光经拉曼扩束镜38扩束准直,穿过拉曼双色片37,经拉曼物镜31聚焦至检测细管17中拉曼聚焦点30处的待测血液21;产生的后向拉曼散射信号沿拉曼发射轴32通过拉曼物镜31,经拉曼双色片37反射后沿拉曼接收轴36行进,拉曼耦合镜35耦合进拉曼光纤34,拉曼耦合镜35中有瑞利滤光片40,可滤去拉曼回波信号中的与泵浦光波长相同的瑞利散射信号,进入拉曼光纤34中的拉曼信号再进入拉曼光谱仪33,分光与光电转换后得到拉曼光谱供后续分析;

[0039] 拉曼发射轴32、拉曼接收轴36垂直、发射光轴14、接收光轴4等四轴共面,拉曼发射轴32与拉曼接收轴36垂直,发射光轴14与接收光轴4垂直,拉曼发射轴32与发射光轴14平行;光纤耦合镜5与紫外激光扩束镜10孔径相等,且两者到双色片3的距离 L_2 与 L_1 相等,基本满足共焦对称要求;拉曼耦合镜35与拉曼扩束镜38孔径相等,且两者到拉曼双色片37的距离 L_3 与 L_4 相等,基本满足共焦对称要求;

[0040] 数字延迟发生器9以脉冲外触发方式,启动紫外低重频脉冲激光器11和条纹相机传感器8,并设置两个外触发脉冲之间的延时 T (本实施例为100ns),以得到最佳信噪比的时域分辨荧光光谱;

[0041] 主控制器12输入输出端口控制程序可实现对三维电动平台1、电动推进器24、试剂推进器25、数字延迟发生器9、条纹相机传感器8、拉曼激光器39、拉曼光谱仪33、自聚焦模组41的控制;且可接收拉曼光谱仪33输出的共焦拉曼光谱信息以及条纹相机传感器8输出的免疫时域分辨荧光光谱信息,并构建对应珍稀动物血液的综合光谱数据库,进行血液分析与分类鉴别,实现数据库的查询和远程传输;还可通过无线网络收发器13联接海关部门云系统,实现数据库的上传、下载与云端查询;

[0042] 本发明提出的微流控共焦拉曼时域分辨荧光光谱血液检测方法包括以下步骤:

[0043] (1) 初始化及自聚焦

[0044] 将珍稀动物待测血液21注入血液管20,将螯合标记物23注入试剂管22;将自动进样台19的电动推进器24、检测细管17、血液管20、血液接头18组装好;将试剂进样台28的试剂推进器25、试剂管22、试剂接头29、Y形管26组装好;将中间接头27联接好检测细管17与Y形管26;将Y形管26与废液罐16接好;然后将整个自动进样系统安装于三维电动平台1上;

[0045] 主控制器12发出指令启动电动推进器24,以一定的速度推动血液管20中的待测血液21通过血液接头18流入检测细管17,并通过中间接头27流入Y形管26;主控制器12发出指令启动试剂推进器25,以一定的速度推动试剂管22中的螯合标记物23与检测细管17中的待测血液21在Y形管26中相遇混合,产生免疫反应后,生成荧光标记位点,得到标记血液15,从

Y形管26出口流出；

[0046] 主控制器12发出指令，启动数字延迟发生器9；数字延迟发生器9按设置的延迟T，发出两个触发脉冲，先后启动紫外低重频脉冲激光器11和条纹相机传感器8；主控制器12发出指令，使条纹相机传感器8工作于单帧曝光模式，并设置曝光时间Es（本实施例为10ms）；

[0047] 紫外低重频脉冲激光器11发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至Y形管26出口区域，产生的后向信号经光纤耦合镜5耦合进入荧光光谱仪7，到条纹相机传感器8进行光电转换；条纹相机传感器8将采集到的光谱信号（本实施例光谱范围为266–540nm）传送到主控制器12；主控制器12计算该光谱信号的总强度I（注：光谱曲线包围的总面积）；

[0048] 主控制器12发出指令，控制三维电动平台1沿XYZ三个轴进行步进微动调整，在每个位置，数字延迟发生器9按设置的延迟T，发出两个触发脉冲，先后启动紫外低重频脉冲激光器11和条纹相机传感器8；主控制器12计算该位置回波光谱信号的总强度I，直至I到达最大值，此时，紫外激光已准确聚焦至Y形管26出口的标记血液15；

[0049] (2) 共焦拉曼光谱信息获取

[0050] 主控制器12发出指令启动自聚焦模组41、拉曼激光器39及拉曼光谱仪33，并设定拉曼光谱仪33的曝光时间；拉曼激光器39发出的拉曼泵浦激光扩束聚焦至检测细管17区域，产生的后向信号经拉曼耦合镜35耦合进入拉曼光谱仪33，拉曼光谱仪33将采集到的光谱信号传送到主控制器12；主控制器12计算该光谱信号的总强度IR（注：光谱曲线包围的总面积）；

[0051] 主控制器12发出指令，由自聚焦模组41带动拉曼物镜31沿拉曼发射轴32上下移动，在每个位置，主控制器12计算该位置回波光谱信号的总强度IR，直至IR到达最大值，此时，拉曼泵浦激光准确聚焦至检测细管17中的待测血液21；在此紧聚焦状态下，拉曼光谱仪33将拉曼聚焦点30处待测血液21的拉曼光谱信号传送到主控制器12；

[0052] (3) 免疫时域分辨荧光光谱信息获取

[0053] 在此紧聚焦状态下，主控制器12发出指令，使条纹相机传感器8工作于连续多帧采集模式；设置单帧曝光时间Em（此实施例为8ms）、采样周期 Δt （本实施例为10ms）以及总采集时间B（此实施例为500ms）；数字延迟发生器9按设置的延迟T，发出两个触发脉冲，先后启动紫外低重频脉冲激光器11和条纹相机传感器8；

[0054] 紫外低重频脉冲激光器11发出的紫外脉冲激光扩束聚焦至标记血液15，产生的后向免疫荧光信号经光纤耦合镜5耦合进入荧光光谱仪7，到条纹相机传感器8进行光电转换；

[0055] 条纹相机传感器8将采集到的光谱信号（本实施例光谱范围为266–540nm）传送到主控制器12；条纹相机传感器8按设置好的单帧曝光时间Em（此实施例为8ms）、采样周期 Δt （本实施例为10ms）以及总采集时间B（此实施例为500ms）进行时域分辨高速连续曝光，将随时间衰减的由单发激光脉冲激发的 $B/\Delta t$ （本实施例为 $500\text{ms}/10\text{ms}=50$ ）个荧光光谱记录下来并送至主控制器12；

[0056] (4) 综合光谱数据后处理

[0057] 主控制器12对待测血液21的共焦拉曼谱线、以及 $B/\Delta t$ 个荧光光谱进行曲线形态，曲线时域变化速率等参数进行提取及分析，构建其综合光谱特征数据库，并将数据库信息通过无线网络收发器13送至出入境监管部门云系统；对珍稀动物血液进行快速检测、建库与识别，方便海关进出口检测检疫部门进行珍稀动物的溯源、鉴别及保护。

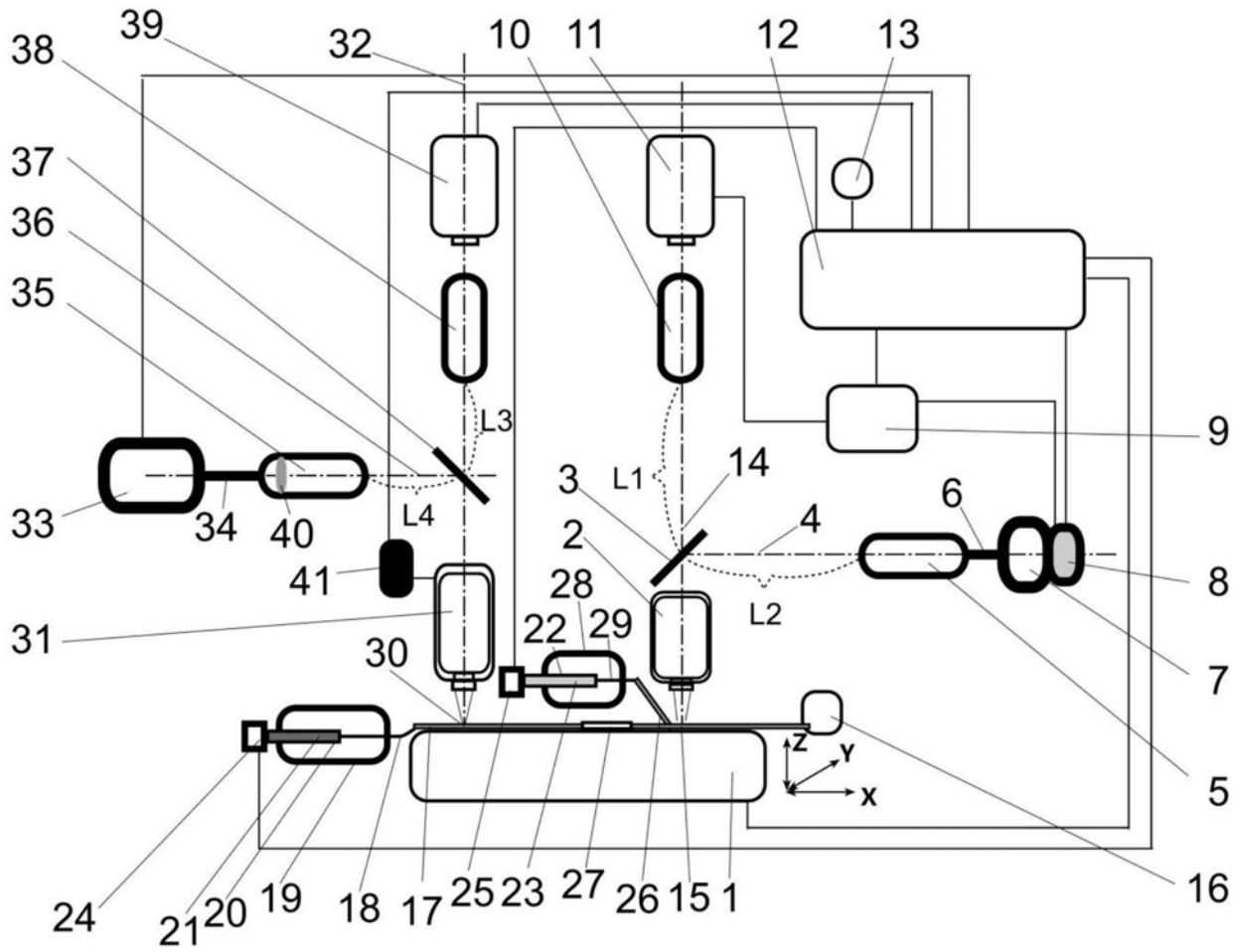


图1

专利名称(译)	一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法		
公开(公告)号	CN110672831A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN201910850369.4	申请日	2019-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海技术物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海技术物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海技术物理研究所		
[标]发明人	万雄 王泓鹏 袁汝俊		
发明人	万雄 王泓鹏 袁汝俊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/65 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/65 G01N33/5302		
代理人(译)	郭英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于共焦拉曼免疫时域分辨荧光的动物血液检测方法，该方法是在微流控共焦拉曼免疫时域分辨荧光检测仪上实现的，该方法包括初始化及自聚焦、共焦拉曼光谱信息获取、免疫时域分辨荧光光谱信息获取、综合光谱数据后处理四个步骤。本发明的有益效果是，光路的共焦设计可有效提高空间分辨率，可对血液中的微小区域分子进行探测；长荧光寿命免疫标记为多次时域分辨采样提供了基础；条纹相机传感器光谱仪实现单次激光诱导荧光多次采集；共焦拉曼与多幅时域荧光提供综合光谱信息，提高物种血液鉴别能力。

